

РСТ

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюроМЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТ(51) Международная классификация
изобретения⁶:
A61K 35/78

A1

(11) Номер международной публикации: WO 96/02266
(43) Дата международной
публикации: 1 февраля 1996 (01.02.96)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU95/00146

(22) Дата международной подачи:
6 июля 1995 (06.07.95)(30) Данные о приоритете:
94027342 15 июля 1994 (15.07.94) RU(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме
US): СОВМЕСТНОЕ РУССКО-ИЗРАИЛЬСКОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ЗАКРЫТОГО ТИПА "ПРЕНАТАЛЬНАЯ БЕЗО-
ПАСНОСТЬ" [RU/RU]; 193318 Санкт-Петербург,
пр. Солидарности, д. 6 (RU) [SOVMESTNOE RUS-
SKO-IZRAILSKOE PREDPRIYATIE AKTSIONER-
NOE OBSHESTVO ZAKRYTOGO TIPA "PRENA-
TALNAYA BEZOPASNOST", St.Petersburg (RU)].(71)(72) Заявитель и изобретатель: КОТИН Аркадий
Михайлович [RU/RU]; 188350 Ленинградская обл.,
Гатчина, ул. Рошинская, д. 15, корп. 1, кв. 51 (RU)
[KOTIN, Arkady Mikhailovich, Gatchina (RU)].

(72) Изобретатель; и

(75) Изобретатель / Заявитель (только для US): БИЧЕ-
ВАЯ Наталья Константиновна [RU/RU]; 195257
Санкт-Петербург, пр. Науки, д. 10, корп. 2, кв. 14
(RU) [BICHEVAYA, Natalya Konstantinovna, St.Pe-
tersburg (RU)].(74) Агент: КОТИН Олег Аркадьевич [RU/RU]; 188350
Ленинградская обл., Гатчина, ул. Рошинская, д. 15,
корп. 1, кв. 51 (RU) [KOTIN, Oleg Arkadievich, Gat-
china (RU)].(81) Указанные государства: CA, JP, US, европейский
патент (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE).

Опубликована

С отчетом о международ

(54) Title: ANTI-TERATOGENIC AGENT

(54) Название изобретения: АНТИТЕРАТОГЕННОЕ СРЕДСТВО

(57) Abstract

The proposed anti-teratogenic agent is a preparation of biomass of the plant *Polyscias filicifolia* obtained by tissue culture. The proposed preparation can be used in the form of dry biomass of *Polyscias filicifolia* or in the form of extracts based on water or alcohol and obtained by three-stage extraction from dry *Polyscias filicifolia* biomass using distilled water or a solution of one part in ten (by weight) of ethanol. The ethanol extracts are the most suitable for use in the prevention of teratogenic effects.

Антитератогенное средство представляет собой препарат биомассы растения *Polyscias filicifolia*, полученный методом культуры тканей. Указанный препарат можно использовать в виде сухой биомассы *Polyscias filicifolia*, а также в виде водных или спиртовых экстрактов, полученных методом трехкратной экстракции сухой биомассы *Polyscias filicifolia* дистиллированной водой или раствором этанола в весовом соотношении 1/10. Наиболее целесообразно для предотвращения тератогенных эффектов использовать этанольные экстракты биомассы.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	Австрия	FI	Финляндия	MR	Мавритания
AU	Австралия	FR	Франция	MW	Малави
BB	Барбадос	GA	Габон	NE	Нигер
BE	Бельгия	GB	Великобритания	NL	Нидерланды
BF	Буркина Фасо	GN	Гвинея	NO	Норвегия
BG	Болгария	GR	Греция	NZ	Новая Зеландия
BJ	Бенин	HU	Венгрия	PL	Польша
BR	Бразилия	IE	Ирландия	PT	Португалия
CA	Канада	IT	Италия	RO	Румыния
CF	Центральноафриканская Республика	JP	Япония	RU	Российская Федерация
BY	Беларусь	KR	Корейская Народно-Демократическая Республика	SD	Судан
CG	Конго	KR	Корейская Республика	SE	Швеция
CH	Швейцария	KZ	Казахстан	SI	Словения
CI	Кот д'Ивуар	LI	Лихтенштейн	SK	Словакия
CM	Камерун	LK	Шри-Ланка	SN	Сенегал
CN	Китай	LU	Люксембург	TD	Чад
CS	Чехословакия	LV	Латвия	TG	Того
CZ	Чешская Республика	MC	Монако	UA	Украина
DE	Германия	MG	Малагаскар	US	Соединенные Штаты Америки
DK	Дания	ML	Мали	UZ	Узбекистан
ES	Испания	MN	Монголия	VN	Вьетнам

АНТИТЕРАТОГЕННОЕ СРЕДСТВО

Область техники

Предлагаемое изобретение относится к медицине, а именно к производству лекарственных препаратов из растительного сырья, и может быть использовано в акушерской практике в качестве фармакологического антитератогенного средства, снижающего или предотвращающего риск аномалий развития, индуцированных токсическими воздействиями, в частности, алкогольной интоксикацией в период беременности, а также может быть использовано в пищевой промышленности в качестве добавки, снижающей токсичность спиртных напитков.

Предшествующий уровень техники

Из общедоступных литературных источников не известны свидетельства целенаправленного поиска антитератогенных средств, хотя с осложнением экологических проблем наблюдается рост всевозможных аномалий развития, включая различные врожденные нарушения высшей нервной деятельности человека. Беспрецедентных пределов достигла частота врожденной патологии и ранней перинатальной гибели в нашей стране. В этой связи необходима разработка фармакологических средств - антитератогенов, защищающих антенатальное (внутриутробное) развитие человека от тератогенноактивных факторов среды, в том числе производственных и бытовых вредностей.

Из литературы известны единичные свидетельства антитератогенного действия различных химических соединений (Barbura F. Nales Modification of the teratogenecity and mutagenecity of cyclophosphamid with thiol components. /Teratology, 23, p. 373 - 381, 1980). В частности, в этой работе было показано, что цистин и глутатион существенно снижают тератогенное действие такого алкилирующего соединения как циклофосфамид.

Однако цистин предотвращал преимущественно аномалии конечностей, тогда как уродства развития центральной нервной системы (ЦНС) сохранялись. Глутатион предотвращал как уродства конечностей, так и аномалии ЦНС, однако его защитное действие эффективно проявлялось только при высоких дозах глутатиона - 400 мг/кг, что в принципе

- 2 -

исключает возможность его использования в качестве антитератогенного средства для лечения человека.

Известно также использование селенита натрия (Котин А.М., Чеботарь Н.А. Антитератогенные свойства селенита натрия : предотвращение эмбриотоксического действия циклофосфида. /Доп . ВИНТИ № 3374 - 84 от 23.05.1984 г.), который является более эффективным, чем цистин и глутатион антитератогеном по отношению к тому же модельному тератогену - циклофосфамиду.

Селенит натрия также эффективно предотвращает тератогенное действие солей некоторых тяжелых металлов (Holmberg R., Fern V. Interrelationship of selenium, cadmium and arsenic in mammalian teratogenesis ./ Arch. Environ. Health, 1V, p. 873 - 877 , 1969). Являясь незаменимым микроэлементом, селен действительно необходим в качестве протективного средства против ряда тератогенных воздействий, в силу чего необходимо адекватное содержание этого микроэлемента в рационе беременных женщин .

Однако использование его в качестве препарата для предотвращения уродств небезопасно, поскольку токсические и терапевтические дозы этого элемента весьма близки, в силу чего весьма вероятны токсические проявления действия селена от передозировки этого соединения .

Как известно, значительные успехи в снижении частоты врожденных уродств ЦНС были достигнуты при использовании комплекса витаминов в первый триместр беременности (Smithells R.W., Sheppard S., Schorah C.J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. / Arch. Dis. Child. , 51 , p. 944 - 950 , 1976). Эффективность в этом случае достигается за счет снятия авитаминозов, являющихся фактором риска при развитии нервной системы. Очевидно, что утверждение о том, что соответствующий комплекс витаминов должен стать обыденным профилактическим средством при беременности, особенно на ранних стадиях, не вызывает возражений. Впрочем, как и профилактика любой иной алиментарной недостаточности.

Однако, как показывают экспериментальные и

- 3 -

эпидемиологические данные, адекватная диета, являясь одним из факторов повышения неспецифической резистентности организма, все же не предотвращает эмбриогенез от патогенного действия значительного числа химических соединений с широким спектром повреждающего действия: алкилирующих соединений, ингибиторов синтеза нуклеиновых кислот, соединений, индуцирующих перекисное окисление липидов и т.п. Одним из таких соединений, приводящим к развитию характерного синдрома уродств, получившего название "алкогольный синдром плода", является алкоголь (этиловый спирт). Частота алкогольного синдрома плода в России достигла катастрофических размеров, грозя окончательно разрушить интеллектуальную структуру общества.

Этиловый спирт в организме метаболизирует до токсических (ацетальдегид, супероксидные радикалы и т.п.) и фармакологически активных (β - карболины, тетрагидроизохинолины и др.) соединений, каждое из которых обладает существенной тератогенной активностью, вызывая не только морфологические уродства, но и глубокие поражения высшей нервной деятельности, вплоть до дебильности (Streissguth A.P. , Londesman D.S. , Martin J.C. , Smith D.W. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. / Science , v.209 , p. 353 -361 , 1980). Поэтому снижение тератогенного потенциала этилового спирта, являясь социально значимой задачей, одновременно важно и с общепрофилактических позиций - как поиск фармакологических средств, предотвращающих тератогенное действие различных ксенобиотиков (неприродных синтетических средств), в том числе производственных вредностей и лекарств. При этом использование химиотерапевтических средств для снижения токсического действия алкоголя во время беременности исключено, так как синтетические средства могут только усилить тератогенный потенциал этилового спирта. Ярким примером этого является использование дисульфирама у страдающих алкоголизмом беременных женщин, приводящее к повышению тератогенного риска (Алкоголизм. Ред. Морозов Г.В. , Рогинов В.Н. , Бабаян Э.А./ М., " Медицина " ,1988).

- 4 -

Известны также природные средства, снижающие токсическое действие этилового спирта за счет присущих им антиоксидантных свойств: препараты женьшеня (Panax ginseng) (Дардымов И.В. Женьшень, элеутерококк. / М., "Наука", 1976), аралии и элеутерококка (Eleutherococcus) (Брехман И.И., Гордейчук Т.Н., Буланов А.Е. Влияние элеутерококка на эмбриональные эффекты этанола. / Бюлл. СО АН СССР, № 84, стр. 52-57, 1982). Последний представитель аралиевых в эксперименте существенно снижал тератогенный потенциал этилового спирта (Гордейчук Т.Н., Чеботарь Н.А., Конописцева Л.Н., Пучков В.Ф. Профилактика врожденных аномалий развития у крыс. / Онтогенез, т.24, №1, стр. 48-55, 1993), и поэтому рассматривается авторами как ближайший аналог, решающий такую же задачу, что и заявляемое изобретение.

Однако не вызывает сомнений тот факт, что сырьевая база для получения препарата из корней элеутерококка весьма ограничена, как, вследствие ограниченного ареала распространения, так и вследствие истощения его природных ресурсов. Вышеназванные принципиальные ограничения использования аралиевых в качестве средств, снижающих алкогольную интоксикацию (а возможно и в качестве антiterатогенных средств широкого спектра действия из-за присущих этим растениям адаптационных свойств) можно преодолеть за счет получения растительного материала индустриальным способом путем выращивания методом культур тканей, а также нахождением других представителей аралиевых с аналогичными свойствами, но более широким ареалом распространения.

Известно использование биомассы женьшеня, полученной путем выращивания его в культуре тканей, для мобилизации защитных сил организма (Высоцкая Р.И. Культура ткани женьшеня (Биология и перспективы использования в медицине). / Автореф. дисс. на соискание уч. степ. канд. биол. наук, Л-д, 1978). Однако, в открытой литературе не публиковались данные свидетельствующие об антиалкогольных и антiterатогенных свойствах препарата биоженшеня получаемого вышеуказанным методом.

- 5 -

Раскрытие изобретения

В основу изобретения положена задача получения антитератогенного средства, которое позволило бы обеспечить
5 требуемый уровень противозембриотоксического эффекта антитератогенного средства на основе природных соединений по отношению к тератогенным воздействиям при расширении его сырьевой базы для получения антитератогена .

Поставленная задача решается тем, что
10 антитератогенное средство представляет собой препарат биомассы растения *Polyscias fillicifolia*, полученной методом культуры тканей.

Кроме того, антитератогенное средство может представлять собой экстракт указанной биомассы.

15 Применение препарата биомассы, полученной методом культуры тканей растений *Polyscias*, а также ее экстрактов, в качестве антитератогенного средства стало возможным благодаря впервые обнаруженным авторами у препарата биомассы *Polyscias* и экстрактов биомассы противо-
20 эмбриотоксических, антиоксидантных свойств, нормализующих нарушения активности ферментов антиоксидантной защиты: церулоплазмина, супероксиддисмутазы и уровня ПОЛ (перекисного окисления липидов) а также ферментов энергетического обмена: изоформ енолазы эмбриона при
25 развитии алкогольного синдрома плода (АСП). Это позволяет получить антитератогенное средство, которое позволило бы обеспечить необходимый противозембриотоксический уровень на основе растительного сырья при полном отсутствии в России ареала выращивания природного растения.

30 Растительный адаптоген семейства аралиевых - *Polyscias fillicifolia* (полисциас папоротниколистный) является тропическим полукустарником, произрастающим на юге Вьетнама, в Таиланде, на Филиппинах, в Новой Зеландии. Несмотря на то, что ареалом произрастания рода *Polyscias*
35 являются тропики и субтропики, биомасса *Polyscias fillicifolia*, может быть получена в значительном количестве методами культуры тканей растений (подобно биомассе женьшеня).

- 6 -

Препарат биомассы культуры тканей растений *Polyscias filicifolia* (полисциас) получают в настоящее время на Заводе биопрепаратов в г.Кириши и в СП "Пренатальная Безопасность" в г.Санкт-Петербурге, а также на Экспериментально-производственном заводе "Санитас" государства Литва. Один из штаммов культуры тканей растения *Polyscias filicifolia*, полученный в Химико-фармацевтическом институте г.Санкт-Петербурга, был передан во Всесоюзную коллекцию культивирования клеток высших растений и утвержден Всесоюзной комиссией по клеточным культурам АН СССР. (Российская Академия Наук, институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева, 127276, г.Москва, ул. Ботаническая, д.35, штамм *Polyscias filicifolia* за N 24).

Предлагаемое изобретение проверено в лабораторных условиях Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН и СП "Пренатальная безопасность".

Биомассу культуры тканей растения *Polyscias filicifolia* получали на стандартной среде (Слепян Л.М. Михайлова Н.В., Грушевицкий И.В., Блинова К.Ф. Питательная среда для выращивания культуры тканей полисциас папоротниколистного. /Авт. св. № 765358, 1980).

Препараты готовились согласно разработанным авторами техническим условиям (ТУ N 9154-001-06910-186-95). Сырая биомасса *Polyscias* на 90% состоит из паренхимных клеток размером от 30 до 90 мкм. После высушивания при 60°C она представляет собой светло-желтую массу клеток с приятным специфическим запахом и вкусом. В биомассе выявлены следующие биологически активные вещества: 3-5% тритерпеновых гликозидов, 1% β -ситостерина, 2% фруктозы, свободные аминокислоты, лизоглицерины и жирные кислоты. Ни одно из этих соединений прямо не указывает на возможность использования *Polyscias* в качестве антиалкогольного или антитератогенного препарата, которое было обнаружено экспериментально.

Стандартный способ приготовления водных экстрактов биомассы *Polyscias* заключается в трехкратной экстракции высушенной биомассы *Polyscias* дистиллированной водой в весовом соотношении 1/10.

Примеры антитератогенного действия сухого препарата биомассы *Polyscias filicifolia*, полученной методом культуры тканей, и водных экстрактов биомассы приведены в Таблице I.

Таблица I

5	Воздействие	Доза мг/г	К-во эмбрион.	К-во самок	Дни воздей- ствия
	I	2	3	4	5
10	Бипиридил в/бр Этанол в/ж Трехкратно по 2,0х 40%	40 9700	I10	II	I4 I4 (I2 ⁰⁰ , I5 ⁰⁰ 18 ⁰⁰)
15	Порошок Poliscias filicifolia (болтушка с нес- колькими каплями Твина 20 50мг/крыса в/ж)	50 мг/кр	I60	I5	9, I2, I3 и I4 д.б.
20	Бипиридил в/бр Этанол в/ж (трех- кратно 2,0х40%)	40 9700			I4 ⁰⁰ I4 (I2 ⁰⁰ , I5 ⁰⁰ , I8 ⁰⁰)
25	Водный настой Po- liscias filicifo- lia 0,5 в/ж Бипиридил в/бр Этанол в/ж (трех- кратно по 2,0х40%)	40 9700	I77	I5	9, I2, I3 и I4 д.б. I4 I4 (I2 ⁰⁰ , I5 ⁰⁰ , I8 ⁰⁰)
30	Бипиридил в/бр	40	79	7	I4
	Этанол в/ж	9700	89	9	I4

- 8 -

Продолжение Таблицы I

5	Кол-во плодов на 20-й день вскрыт.			Средняя
	Погибших после ИМПЛАНТАЦИИ Абс. % ст.ош.	Живых		масса I плода в гр.
		Всего	Уродливых Абс. % ст.ош.	
10	6	7	8	9
15	13 11,8 ± 3,0	97	32 32,98 ± 4,8	1,790
20	22 13,75 ± 2,7	138	16 8,5 ± 2,4	1,885
25				
30	18 10,6 ± 2,3	159		1,978
35	3 3,8 ± 2,1	76		1,905
	7 7,9 ± 2,8	82		2,011

В этой серии экспериментов отклонения развития вызывали сочетанием действия алкоголя и бипиридила (одного из компонентов железа) в дозах, при которых каждое из соединений и в отдельности не вызывает аномалий развития. Такая постановка эксперимента обусловлена тем, что железодефицитное состояние при беременности, которое моделируется связыванием железа бипиридиллом, является исключительно распространенным явлением.

Как можно видеть из данных, приведенных в Таблице I, как собственно сухая биомасса *Polyscias filicifolia*, вводимая внутривентрально в виде взвеси с эмульгатором Твином-20, так и водный экстракт, предотвращает тератогенные эффекты этанола на фоне железодефицитного состояния. Следовательно, как собственно сухая биомасса *Polyscias filicifolia*, так и ее водные экстракты, могут снимать риск тератогенных эффектов и, что особенно важно, даже в условиях железодефицитного состояния.

Лучший вариант осуществления изобретения

Наиболее целесообразно препарат биомассы *Polyscias filicifolia*, полученный методом культуры тканей использовать в виде этанольных экстрактов этой биомассы.

Стандартный способ приготовления этанольных экстрактов биомассы *Polyscias* заключается в трехкратной экстракции высушенной биомассы *Polyscias* 40 % раствором этанола в весовом соотношении 1/10. (см. ТУ N 9154-001-06910-186-95)

В Таблице 2 приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие о более эффективном предотвращении этанольными экстрактами биомассы острой алкогольной интоксикации по сравнению с препаратами элеутерококка и биоженьшеня.

В этой серии экспериментов из этанольного экстракта биомассы *Polyscias*, приготовленного стандартным образом, выпаривали этанол, остаток лиофилизировали и растворяли в воде. Водный раствор *Polyscias* вводили мышам в дозе 100 мг/кг одновременно с этанолом в дозе 8.8 г/кг массы (в предварительных экспериментах установленная как LD₅₀-летальная доза этанола, вызывающая 50% смертность мышей при

- 10 -

однократном (остром) введении) внутривенно. Гибель животных регистрировали в течение суток после введения препаратов. В этих экспериментах экстракты Polyscias в 100 % случаев предотвращали гибель животных. В то же время экстракты элеутерококка (использовали лиофилизированные аптечные экстракты элеутерококка) и биоженьшеня, приготовленные тем же способом, что и экстракты Polyscias, в той же дозе и при том же способе введения обладали существенно менее выраженным защитным эффектом. При этом наименьшее защитное действие оказывал экстракт элеутерококка. В этой связи в дальнейших сравнительных экспериментах в качестве эталонного аралиевого препарата использовали не известный аналог Polyscias по антитератогенному действию - экстракт элеутерококка, а еще более близкие как по способу получения, так и по антиалкогольной активности при острой алкогольной интоксикации, но менее известные из литературы препараты биоженьшеня (Мирошниченко И.В., Ярилин А.А. Различное действие тонизирующих средств на иммунный ответ. /Хим.-Фарм. журн., т. XIX, вып. 2, стр. 139-142, 1986).

Таблица 2

Воздействие	Количество животных в группе	Количество погибших животных	Процент гибели животных
этиловый спирт	50	28	56
этиловый спирт + Polyscias	27	0	0
этиловый спирт + элеутерококк	17	7	41
этиловый спирт + женьшень	14	2	14

Была также проведена серия экспериментов по предотвращению нарушений энергетического обмена при острой алкогольной интоксикации. При этом исследовали активность

- II -

одного из важнейших ферментов энергетического обмена - креатинкиназы. Креатинкиназа катализирует взаимопревращение креатина и фосфокреатина в реакции с участием АТР и АДФ. В мозговой ткани креатинкиназа поддерживает стабильный уровень универсального макроэнергетического соединения - АТР, необходимого, в частности, для синтеза нейромедиаторов и биоэлектрической активности мозга.

Этанол в виде 25% раствора вводили крысам внутривентрикулярно в дозе 3 г/кг за 3 часа до забоя животных. Экстракт вводили аналогично в дозе 20 мг/кг за 1 час непосредственно перед забоем. Активность креатинкиназы определяли непосредственно после забоя животных и выражали в МЕ (международных единицах) в расчете либо на 1 мг суммарного растворимого белка мозговой ткани, либо на 1 л сыворотки крови (Стальная И.Д. Современные методы в биохимии./ М., "Медицина", стр. 62-68, 1977).

Результаты экспериментов приведены в Таблице 3.

Таблица 3

Воздействие	Количество животных в группе	Активность креатинкиназы	
		мозг МЕ/мг	сыворотка крови МЕ/л
контроль	22	9.15 ± 0.1	2138 ± 102
этиловый спирт	12	8.0 ± 0.1	3480 ± 144
этиловый спирт + Polyscias	12	11.0 ± 0.3	2065 ± 249
этиловый спирт + женьшень	10	8.3 ± 0.2	2977 ± 122

Из таблицы следует, что экстракт биомассы Polyscias полностью нормализовал вызванные этанолом подавление активности креатинкиназы в мозге и ее повышение в сыворотке крови. И в этом отношении экстракт биомассы Polyscias был более эффективен, чем экстракт женьшеня при той же дозе.

- 12 -

В Таблице 4 представлены также результаты опытов по предотвращению гибели плодов крыс при хроническом потреблении самками алкоголя в период беременности и лактации .

Таблица 4

Воздействие	Количество самок	Количество плодов в помете	Масса при рождении, г	Постна- тальная гибель, %
	ПЛОДОВ			
контроль	9/129	12 ± 2	6.3 ± 0.7	0
этиловый спирт	21/199	9 ± 3	5.3 ± 0.9	25 ± 10
этиловый спирт				
+ полисциас	15/153	10 ± 2	6.4 ± 0.8	3 ± 3
этиловый спирт				
+ женьшень	7/52	8 ± 2	6.3 ± 0.4	14 ± 3

Добавление в питьевой раствор самок крыс (единственный источник питья - 20%-ный раствор этанола) с первого дня беременности и до окончания лактации этанольного экстракта биомассы *Polyscias* до конечной концентрации 0.008) (в расчете - объем экстракта на объем раствора) приводило к тому, что доля погибших новорожденных в первые 2 недели жизни уменьшалась с 25% до 3% .

Доля погибших в случае аналогичного использования экстракта женьшеня в тех же дозировках составила 14% .

Таким образом экстракт биомассы *Polyscias* оказался значительно более эффективным средством, чем экстракт женьшеня при предотвращении гибели плодов.

Авторами также был проведен опытный анализ задержки развития плодов вызванной хроническим воздействием на самок алкоголя в период беременности и лактации. Результаты этого анализа приведены в Таблице 5.

Интоксикация алкоголем крыс приводила к уменьшению среднего числа новорожденных в помете на 25% и массы тела новорожденных в момент рождения на 16% , а также к снижению скорости прироста массы тела в ходе постнатального развития

- 13 -

на 26% (на протяжении первых 15 дней жизни) и к увеличению постнатальной гибели животных на 25% .

Таблица 5

5

10

15

Воздействие	"маятниковый рефлекс"	количество квадратов	Масса при рождении, г
контроль	1.7 ± 0.7	31 ± 11	6.3 ± 0.7
этиловый спирт	6.2 ± 1.4	13 ± 7	5.3 ± 0.9
этиловый спирт + полисциас	2.0 ± 1.0	25 ± 5	6.4 ± 0.8
этиловый спирт + женьшень	2.1 ± 1.0	34 ± 4	6.3 ± 0.4

Одновременно наблюдалась задержка формирования двигательных навыков по данным тестирования 16-дневных крысят по общепринятой методике "открытого поля". Эта задержка выражается, во-первых, в уменьшении на 42% числа посещаемых квадратов поля и в сохранении "маятникового рефлекса", который к этому сроку у контрольных животных уже практически исчезает (норма - 1.7 ; алкоголизация самок -6.2) .

Добавление экстракта биомассы Poliscias в питьевой раствор этанола приводило к нормализации вызванной алкоголизацией самок задержке развития плодов по всем вышеуказанным параметрам.

Аналогичным действием, как следует из Таблицы 5, обладает экстракт женьшеня . Однако его действие менее эффективно, так как он совершенно не обеспечивает увеличение количества новорожденных в расчете на 1 помет по сравнению с группой самок, получавших только раствор этанола и менее эффективно, чем Poluscias, предотвращает постнатальную гибель (Таблица 4) .

Далее была проведена серия опытов по доказательству высокой антиоксидантной активности экстрактов биомассы Poluscias. Опыты, результаты которых представлены в Таблице 6, проводились на 14 - дневных зародышах и новорожденных крысятах в возрасте 21 дня, а также через 1 месяц после отмены алкоголя .

Таблица 6

5	Воздействие	Продукты перекисного окисления липидов		Супероксид-дисмутаза		Церуло-плазмин
		мозг нм/мл	сыворотка нм/мл	мозг ед/мг	сыворотка ед/мг	сыворотка ед/мг
10	контроль: эмбрионы					
	14 день	0.019 ± 0.02	-	80.4± 3.2	-	-
	21 день	1.10 ± 0.04	2.89 ± 0.05	26.6± 1.2	-	0.39 ± 0.02
15	потомство	-	-	29.7±	41.6 ±	1.35 ±
	50 день			2.1	2.9	0.06
	этанол: эмбрионы					
20	14 день	0.088 ± 0.008	-	95.9± 3.82	-	-
	21 день	0.58 ± 0.02	3.34 ± 0.06	31.5± 1.6	-	0.30 ± 0.01
	потомство					
25	50 день	-	-	36.1± 2.4	91.8 ± 6.4	1.00 ± 0.04
	этанол +полисциас: эмбрионы					
30	14 день	0.022 ± 0.002	-	83.0± 4.0	-	-
	21 день	1.56 ± 0.04	2.95 ± 0.04	25.4± 1.1	-	0.38 ± 0.01
	потомство					
35	50 день	-	-	32.3± 1.34	42.6 ± 3.2	1.30 ± 0.08

Продолжение таблицы 6

5	Воздействие	Продукты перекисного окисления липидов		Супероксид-дисмутаза		Церулоплазмин
		мозг нм/мл	сыворотка нм/мл	мозг ед/мг	сыворотка ед/мг	сыворотка ед/мг
10	этанол + женьшень: эмбрионы					
	14 день	-	-	-	-	-
	21 день	1.16 ± 0.08	-	32.6± 1.6	-	-
15	потомство 50 день	-	-	25.7± 1.8	42.1 ± 3.0	1.27 ± 0.08

- 20 Уровень перекисного окисления липидов определяли методом измерения продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (2 ТБК) (Paoletti F., Aldinucci D., Mocallì C. A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in
- 25 tissue extracts. /Anal. biochem., v.54, N 2, p.536-541, 1986). Для определения активности супероксиддисмутазы использовали модифицированный метод, основанный на ингибировании образцом, содержащим СОД (экстракт ткани, сыворотка крови) окисления НАДН, опосредованного
- 30 суперокси д ными р адикалами (Ravin H.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin. /J. Lab. Clin. Med., v. 58, p.161-168, 1961). Для определения активности церулоплазмينا в экспериментах использовали метод Рейвина.
- 35 Добавление экстракта Polyscias в питьевой раствор этанола приводило к снижению уровня перекисного окисления липидов до диапазона нормальных значений и к аналогичному изменению активности ферментов антиоксидантной защиты

- 16 -

организма - супероксиддисмутаза и церулоплазмина как в пре-
так и в постнатальный период воздействия алкоголя (14-днев-
ные зародыши и новорожденные крысы в возрасте 21 дня),
5 так и для животных через 1 месяц после отмены алкоголя, что
доказывает наличие у экстрактов биомассы Polyscias высокой
антиоксидантной активности.

Сравнительное изучение нормализации вышеуказанных
химических изменений с помощью экстрактов биомассы
10 Polyscias и женьшеня, показывает, что по этому показателю
экстракты биомассы Polyscias не уступают препаратам био-
женьшеня и превосходят последний по ряду других тестов.

Помимо исследования антиоксидантных свойств экстрак-
тов биомассы Polyscias и женьшеня, был проведен анализ влия-
15 ния этих препаратов на изоферментный спектр енолазы мозго-
вой ткани. Енолаза является ферментом гликолитического пу-
ти, по которому в метаболизм тканей ЦНС поступает главный
энергетический субстрат мозга - глюкоза. В тканях животных
енолаза представлена 3 димерными изоферментами: $\alpha\alpha$ -, $\alpha\gamma$ -,
20 $\gamma\gamma$ -, причем $\gamma\gamma$ -изоформа является нейроспецифической.

Результаты опытов этой серии экспериментов приведены
в Таблице 7. Видно, что хроническая алкоголизация приводит
к уменьшению доли активности $\gamma\gamma$ -изофермента, причем это
снижение сохраняется спустя значительное время после отмены
25 этанола - до 5 месяцев. Можно считать, что алкоголь
вызывает необратимые изменения изоферментного спектра
енолазы.

На каждом сроке онтогенеза изучены 4 группы крыс по
8-9 животных в каждой группе.

30 Добавление экстракта биомассы Polyscias в питьевой
раствор этанола приводило к полному восстановлению как
удельной активности енолазы, так и динамики нарастания
 $\gamma\gamma$ -изофермента в онтогенезе. В то же время применение
экстракта женьшеня не вызывало подобных эффектов, и
35 соотношение активностей изоферментов енолазы практически
совпадало со спектром енолазы алкоголизированных животных.

Таблица 7

5	Воздействие		Сроки постнатального развития	
			50-й день	5-й месяц
10	контроль	1	0.84 ± 0.03	0.65 ± 0.02
		2	$18.0 : 17.3 : 9.6$	$18.3 : 16.5 : 10.2$
	этиловый спирт	1	0.81 ± 0.03	0.63 ± 0.04
		2	$19.7 : 18.4 : 6.9$	$19.6 : 16.9 : 8.5$
15	этиловый спирт	1	0.80 ± 0.05	0.60 ± 0.06
		2	$18.1 : 17.3 : 9.5$	$18.3 : 16.5 : 10.1$
	+ polyscias	1	0.80 ± 0.05	0.57 ± 0.04
		2	$20.3 : 17.9 : 6.9$	$19.3 : 17.0 : 8.5$

Примечание: 1-удельная активность енолазы (Δ ОП/мин·мг белка); 2- изоферментный спектр енолазы в целом мозге.

На основании приведенных в Таблицах 2-7 результатов экспериментов можно сделать выводы о том, что предлагаемое антитератогенное средство имеет ряд преимуществ по сравнению с выбранными аналогами, а именно:

25 - экстракт биомассы Polyscias в значительно большей степени, чем препарат женьшеня, уменьшает долю погибших плодов при хроническом отравлении алкоголем беременных и лактирующих самок.

30 - экстракт биомассы Polyscias нормализовал вызванную алкоголизацией беременных и лактирующих самок задержку развития плодов как по ростовым, так и по поведенческим показателям. Препарат женьшеня был менее эффективен в этом отношении.

35 - экстракт биомассы Polyscias эффективен в предотвращении гибели животных от острой алкогольной интоксикации, причем его действие выражено значительно более сильно, чем действие препаратов элеутерококка и биоженшеня при сходных условиях опытов. Помимо этого, экстракт биомассы Polyscias нормализовал активность креатинкиназы в мозговой ткани и

- 18 -

сыворотки крови, превосходя по этой способности препараты биоженьшеня.

5 - экстракт биомассы Polyscias обладает высокой антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью такого мощного антиоксиданта как женьшень. Однако, действие препарата биомассы Polyscias при предотвращении биохимических изменений в тканях плода, вызванных хроническим отравлением алкоголем беременных и лактирующих
10 самок, как установлено нами, не ограничивается лишь его антиоксидантными эффектами. Только экстракт биомассы Polyscias обнаруживал способность к полной нормализации такого важного биохимического показателя энергетического метаболизма мозга как изоферментный спектр енолазы.

15 В приведенном ниже примере показано, что экстракты биомассы Polyscias эффективны не только в предотвращении тератогенного действия алкоголя, но и защищают плод от воздействия тератогенов с иным спектром метаболической активности .

20 Для доказательства этого положения был использован наиболее изученный тератоген млекопитающих: антималярийный препарат - хлоридин (2,4 - диамино- 5 - параклорфенил - 6 - этилпиримидин), тормозящий синтез ДНК и вызывающий у плодов крыс характерный комплекс уродств - " хлоридиновый
25 синдром уродств " .

По данным И.М.Акимовой (Акимова И.М. Сравнение тератогенного действия хлоридина и актиномицина Д и анализ аномалии развития скелета эмбрионов крыс./ Дисс. на соиск. науч. степ. канд. мед. наук, Л-д, ИЭМ АМН СССР, 1968)
30 максимальный эмбриотоксический эффект хлоридин оказывает на I-е и 13-е сутки эмбриогенеза крыс. По нашим данным, при внутрижелудочном введении хлоридина в дозе 1мг/кг на ранних стадиях эмбриогенеза крыс (1,2,3 день беременности) доимплантационная гибель составила 67.1%, а постимплантационная - 54.8%. Комплексное введение экстракта биомассы Polyscias (1 мг/кг) и хлоридина (1 мг/кг) на 1,2,3 день беременности привел к снижению доимплантационной гибели почти вдвое - 39.5%(p < 0.05). Однако при этом способе введения постимплантационная гибель зародышей оставалась высокой -

- 19 -

63.8%, по-видимому, за счет имплантации нежизнеспособных зародышей.

5 При внутрижелудочном введении хлорида в дозе 15 мг/кг на 13 день беременности (I группа) постимплантационная гибель зародышей составила 7.5%, аномальных зародышей - 88.5%. Все аномальные зародыши имели
10 ярко выраженные, характерные для хлорида отечность, микроцефалию, гипогнатию, микромелию, укорочение хвоста, аномалии конечностей, включая брахидактилию, гемимелию, гематомы на местах отсутствующих пальцев.

Средняя масса тела плода после воздействия хлоридом на 13 день беременности составила 1.54 ± 0.21 г.

Напротив, при профилактическом введении экстрактов
15 биомассы Polyscias его антитератогенные свойства проявлялись вполне отчетливо. Так, при профилактическом введении экстракта биомассы Polyscias внутрижелудочно с I по II день беременности (в дозе 1 мг/кг) с последующим
20 введением хлорида на 13 день беременности (15 мг/кг) (II-я группа) и при предварительном введении экстракта биомассы Polyscias на II, 12 и 13 день беременности (1 мг/кг) с совмещенным введением хлорида на 13 день беременности в дозе 15 мг/кг (III-я группа) были получены
следующие результаты:

25 Количество аномальных зародышей в I группе составило 88.5%, во II группе - 57.4%. Таким образом, наиболее эффективное антитератогенное действие Polyscias оказывает при длительном профилактическом введении.

Эмбриотоксическое действие хлорида при одном и том же способе введения на 13 день беременности также
30 достоверно зависело от введения препарата биомассы Polyscias и составляло 96.5%, 68% и 58.8% в I, II и III группах соответственно.

Следует отметить, что спектр и тяжесть уродств
35 изменяется при введении хлорида на фоне препарата. Так спектр аномалий в группе с предварительным введением Polyscias с I по II-ый день беременности (II группа) не отличался от комплекса аномалий в группе крыс, которым вводили только хлорид (I группа). Напротив, после

- 20 -

введения препарата биомассы *Polyscias* непосредственно на фоне тератогена были отмечены только изолированные аномалии нижних конечностей (адактилия и брахидактилия) при
5 отсутствии характерного " хлоридинового синдрома уродств ". Снижение эмбриотоксического эффекта в данной экспериментальной группе выразалось не только в снижении частоты появления аномальных зародышей и сужении спектра аномалий, но и в достоверном повышении средней массы
10 плода практически до уровня контрольного значения - $2.20 \pm 0.23\text{г}$ про т и в $1.55 \pm 0.25\text{г}$, когда хлоридин вводили изолированно.

Таким образом, применение заявляемого антiterатогенного средства с широким спектром действия,
15 представляющего собой препарат биомассы, полученный методом культуры тканей, или экстракты биомассы *Polyscias filicifolia* позволяет наряду с высокой антиоксидантной активностью повысить эффективность нормализации активности ферментов энергетического обмена по сравнению с известными
20 антiterатогенными средствами. Это, в свою очередь, позволяет повысить уровень противозембриотоксического эффекта антiterатогенного средства на основе растительного сырья к тератогенным воздействиям при расширении его сырьевой базы для получения препарата .

25 Промышленная применимость

Предлагаемое изобретение может быть использовано в акушерской практике для защиты плода человека, а также в пищевой промышленности при производстве алкогольных напитков с пониженной токсичностью.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTERIPC⁶: A61K 35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: A61K 35/00, 35/78, A01H 4/00, C12N 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A1, 92/21357 (KREWEL-WERKE GMBH) 10 December 1992 (10.12.92)	1-2
A	WO, A1, 92/22307 (KANEBO LTD), 23 December 1992 (23.12.92), the abstract	1-2
A	US, A, 4618495 (TSUMURA JUNTENDO INC.), 21 October 1986 (21.10.86)	1-2
A	US, A, 5225203 (YOUNG S.KIM), 06 July 1993 (06.07.93)	1-2
A	US, A, 5230889 (IWATANI SANGYO KABUSHIKI KAISHA), 27 July 1993 (27.07.93)	1-2
A	US, A, 5324516 (DOSSAN TECHNIKAL CENTER et al), 28 June 1994 (28.06.94)	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 August 1995 (21.08.95)Date of mailing of the international search report
30 August 1995 (30.08.95)

Name and mailing address of the ISA/ RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка No
PCT/RU 95/00148

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: A61K 35/78
Согласно Международной патентной классификации (МКИ-6)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (Система классификации и индексы) МКИ-6: A61K 35/00, 35/78, A01H 4/00, C12N 5/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория *	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту No.
A	WO, A1, 92/21357 (KREWEL-WERKE GMBH) 10 декабря 1992 (10.12.92)	1-2
A	WO, A1, 92/22307 (KANEBO LTD), 23 декабря 1992 (23.12.92), реферат	1-2
A	US, A, 4618495 (TSUMURA JUNTENDO INC.), 21 октября 1986 (21.10.86)	1-2
A	US, A, 5225203 (YOUNG S. KIM), 06 июля 1993 (06.07.93)	1-2

☒ последующие документы указаны в продолжении графы С ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:
"А" - документ, определяющий общий уровень техники.
"Е" - более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее.
"О" - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"Р" - документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета.

"Т" - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения.
"Х" - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочающий новизну и изобретательский уровень.
"У" - документ, порочающий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории.
"&" - документ, являющийся патентом-аналогом.

Дата действительного завершения международного поиска
21 августа 1995 (21.08.95)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске
30 августа 1995 (30.08.95)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
Всероссийский научно-исследовательский институт государственной патентной экспертизы, Россия, 121858, Москва, Бережковская наб. 30-1
факс (095)243-33-37, телетайп 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

Л. Столярова

тел. (095)240-58-88

С. (Продолжение) ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория *)	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту No.
A	US. A. 5230889 (IWATANI SANGYO KABUSHIKI KAISHA). 27 июля 1993 (27.07.93)	1-2
A	US. A. 5324516 (DOSSAN TECHNIKAL CENTER и др.). 28 июня 1994 (28.06.94)	1-2